Die Antigenstruktur von Viruspartikeln und leeren Kapsiden bei Adenoviren

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Irmgard Kron

Saarbrücken

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr.med., Dr.phil. W. Zimmermann

Die Antigenstruktur von Viruspartikeln und leeren Kapsiden bei Adenoviren

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
Irmgard Kron
geb. am 1.9.1941 in Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr.med. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr.med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 15.3.1973 abgelegt.

I. Einleitung

1) Adenoviren

Nach ihrer Entdeckung im Jahre 1953 (Rowe et al., 1953) erhielten die Adenoviren zunächst den Namen ARD(acute respiratory disease)-Viren oder APC(adenoidal pharyngeal conjunctival)-Viren, was ihre Beziehungen vorwiegend zu Infektionen des Respirationstraktes bzw. der Konjunktiven verdeutlichen sollte. Ihre heutige Bezeichnung stammt aus dem Jahre 1956 (Enders et al., 1956).

Die Krankheitserscheinungen durch Adenoviren sind im allgemeinen harmloser Natur, doch können bei Kindern auch schwere atypische Pneumonien auftreten. Epidemien kommen hauptsächlich in Kindergärten, Schulen und Rekruteneinheiten vor (Wigand, 1969).

Die Adenoviren gehören zur Gruppe der DNS-Viren. Sie haben einen Durchmesser von 70 bis 80 nm, besitzen ein Nukleoid und einen ikosaedrisch strukturierten Proteinmantel, der aus 252 Untereinheiten (Kapsomeren) besteht. 240 Kapsomere sind auf den Flächen und 12 mit Fortsätzen versehene an den Ecken angeordnet. Dieses Strukturmodell wurde zunächst bei Untersuchungen der Typen 5 (Valentine & Rereira, 1965) und 3 (Norrby, 1966 a) gefunden. 1967 konnte die gleiche morphologische Erscheinungsform für die Typen 13, 15 und 19 gesichert werden (Gelderblom et al., 1967). Inzwischen besitzt dieses Modell für alle Adenoviren Gültigkeit.

Bisher sind 35 menschenpathogene Adenovirustypen bekannt geworden (Pereira et al., 1963; Wigand & Fliedner, 1968; Wigand, 1970), die sich wiederum in 4 Untergruppen unterteilen lassen, je nach Art ihrer hämagglutinierenden Eigenschaften (Rosen, 1960). So weist die Untergruppe I (Typen 3, 7, 11, 14, 16, 21) eine vollständige Agglutination mit Rhesusaffen-Erythrozyten auf. Die Untergruppe II (Typen 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 29, 30; atypisch: 20, 25, 28) läßt eine komplette Agglutination mit Ratten-Erythrozyten erkennen. Einzelne Typen dieser Gruppe (8, 9, 10,

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1
1) Adenoviren 1
2) Adenovirus-Komponenten 2
3) Fragestellung 5

II. Material und Methode 6
1) Pufferlösungen 6
2) Virus-Antigene 6
3) Virusaufarbeitung 6
4) Immunseren 8
5) Humanseren 8
6) Hämagglutination und Hämagglutinationshemmung . 8
7) Komplementbindungsreaktion 10
8) Infektiosität 12

III. Ergebnisse 13
1) Hämagglutinationshemmung mit Viruspartikeln . . 13
2) Hämagglutinationshemmung mit leeren Kapsiden . 13
3) Komplementbindungsreaktion mit Virion 14
a) Aufarbeitung und Nachweis der serologischen Reinheit 14
b) Kreuzreaktionen mit Kaninchen-Immunseren . . 15
c) Reaktion mit Komponentenseren 16
d) Reaktion mit Antikörper-haltigen Humanseren . 17

IV. Diskussion 18

V. Zusammenfassung 23

VI. Literaturverzeichnis 24

Tabellen 29

13, 19, 26, 27) agglutinieren außerdem mit Menschen-O-Blut, andere (9, 13, 15, 23) schwach mit Rhesusaffen-Blutkörperchen. Unter Gruppe III (1, 2, 4, 5, 6) zeigt eine partielle Agglutination mit Ratten-Blutkörperchen. Die Typen 12, 18, 31 (Untergruppe IV) agglutinieren weder Rhesus-Affen- noch Ratten-Erythrozyten.
Neben den menschenpathogenen Adenoviren sind ebenfalls solche vom Affen, von Rindern, Hunden, Schweinen, Mäusen und Vögeln nachgewiesen worden (Pereira et al., 1963).

In wirtsspezifischen Zellkulturen lassen sich die verschiedenen Adenoviren unter Ausbildung eines sogenannten cytopathischen Effektes vermehren (Rowe et al., 1953). Bei der Viruszüchtung entstehen nicht nur komplette Viruspartikel, deren Morphologie oben beschrieben wurde, sondern auch inkomplette sowie lösliche Komponenten, die im Überschuß gebildet werden.

2. Adenovirus-Komponenten

Sowohl die kompletten und inkompletten Viruspartikel als auch die löslichen und vom kompletten Virus abtrennbaren virusspezifischen Antigene werden unter dem Begriff " Viruskomponenten " zusammengefaßt. Im Folgenden soll eine kurze Erläuterung zu den für diese Arbeit relevanten, einzelnen Komponenten gegeben werden.

1. Unter den kompletten Viruspartikel (Virion) versteht man das gereinigte infektiöse Virus, dessen Morphologie dem oben angegebenen Strukturmodell entspricht und dessen Größe ca. 70 bis 80 nm beträgt. Im Cäsium-Chlorid-Gradienten weist es eine Dichte von 1,35 g/ml auf (Gelderblom et al., 1967). Nachweisbar ist es durch Hämagglutination mit Ratten-Erythrozyten und durch seine Infektiosität.
2. Die inkompletten Viruspartikel (leere Viruskapside) haben äußerlich die gleiche Morphologie und Größe wie die Viria, doch fehlt ihnen die DNS und damit die Infektiosität. Ihre Dichteim Cäsium-Chlorid-Gradienten liegt bei 1,31 g/ml. Wie das Virion lassen auch sie sich durch

Hämagglutination nachweisen.

3. Das Dodecon (lösliches Hämagglutinin) besteht aus 12 Pentons (Gelderblom et al., 1967) und läßt sich durch Hämagglutination mit Ratten-Erythrozyten und bei einigen Typen auch mit Menschen-O-Blutkörperchen nachweisen. Dieses lösliche Hämagglutinin ist allen Mitgliedern der Untergruppe II eigen (Bauer et al., 1964; Liem et al., 1971). Die Dichte des Dodecon im Cäsium-Chlorid-Gradienten beträgt 1,29 g/ml (Gelderblom et al., 1967). Die Sedimentationskonstante der Dodeca der Untergruppe II liegt bei 65 $\pm$ 10 S (Liem et al., 1971). Eine Infektiosität besteht auch hier nicht. Das Dodecon ist in der Lage, neutralisierende Antikörper zu induzieren (Gelderblom et al., 1968).
4. Hexon (Ginsberg et al., 1966) ist gleichbedeutend mit freien Kapsomeren mit Ausnahme der Scheitelkapsomere, die andere Eigenschaften haben. Ihre polygonal tubuläre Struktur (Norrby, 1966 ; Gelderblom et al., 1967) stimmt mit der Morphologie der nicht eckständigen Kapsomere am intakten Virion bzw. Kapsid überein. Die Dichte des Hexon im Cäsium-Chlorid-Gradienten beträgt 1,30 g/ml und seine Sedimentationskonstante 11,5 bis 13 S (Gelderblom et al., 1967). Die Hexon-Komponente trägt ein gruppenspezifisches, allen Adenoviren gemeinsames Antigen, welches mit der Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden kann. Außerdem weist Hexon ein typenspezifisches Antigen ε auf, das neutralisierende Antikörper induziert (Norrby 1968 a; Gelderblom et al., 1968). Diese typenspezifischen Antikörper reagieren zudem in der Hämagglutinationshemmung mit Virion als Antigen jedoch nicht in der Hämagglutinationshemmung mit Dodecon (Norrby 1968 a ; 1969 a; 1969 b). Ein Nachweis der Typenspezifität des Hexons in der Komplementbindungsreaktion läßt sich durch Antihexonserum, welches mit heterotypischem (Norrby & Wadell, 1969) bzw. homotypischem (Norrby, 1969 b) Hexonantigen absorbiert wurde, erbringen.
5. Fiber (Ginsberg et al., 1966) ist gleich bedeutend mit faserförmigen, sich am Ende verdickenden Strukturen an den Scheitelkapsomeren. Sie sind Träger des typenspezifischen

Antigens γ, das für die indirekte Hämagglutination, d.h. für die Agglutination von Ratten-Blutkörperchen in Gegenwart geeigneter heterologer Immunseren verantwortlich ist, auch mit hämagglutinationshemmenden Antikörpern reagiert und sich in der Komplementbindungsreaktion nachweisen läßt. (Norrby, 1968 a).

Neutralisierende Antikörper konnten in Antifiberseren der Untergruppe II nicht nachgewiesen werden (Gelderblom et al., 1968). Dieses Antigen γ ist nicht gleich dem Antigen ε des Hexons. Außer dem typenspezifischen Antigen γ , das dem distalen Teil der Fiberkomponente zugeordnet ist, scheint sie im proximalen Anteil ein Antigen δ zu besitzen, das für die Intra- und Intersubgruppen-Spezifität verantwortlich ist (Wadell, 1970). Neben Fiber besitzt auch Hexon Intra- und Intersubgruppen-Spezifität (Wadell 1970; Norrby 1968 a). Die Sedimentationskonstante von Fiber-Antigen liegt bei 6,2 S (Gelderblom et al., 1967).

6. Penton (Ginsberg et al., 1966) besteht in der Einheit von Scheitelkapsomer und Fiberkomponente, daher ist es sowohl Träger des typenspezifischen Antigens γ als auch des untergruppen-spezifischen Antigens δ . Hinzu kommt ein dem Scheitelkapsomer zuzuordnendes Antigen β , das gruppenspezifisch reagiert und gleichzeitig für die Toxinaktivität verantwortlich ist (Bauer & Wigand, 1963; Norrby, 1968 a; Wadell & Norrby, 1969). Dieses gruppenspezifische Antigen ist jedoch nicht mit dem gruppenspezifischen Antigen α des Hexons identisch. Penton läßt sich in der indirekten Hämagglutination nachweisen. In der Untergruppe II ist bisher nur für die Typen 9, 15 und 9-15 neben der Fiberkomponente das Penton als ursächlich für indirekte Hämagglutination wahrscheinlich gemacht worden (Norrby, 1968 b).

3) Fragestellung

Nachdem das Strukturmodell der Adenoviren auch für die Typen der Untergruppe II bestätigt werden konnte, wurden die gereinigten löslichen Komponenten, vor allem das Dodecon dieser Gruppe hinreichend untersucht (Gelderblom et al., 1967; Norrby, 1968 b). Dagegen bestanden für die kompletten und inkompletten Viruspartikel noch Unklarheiten bezüglich ihrer Antigen-Spezifität.

In dieser Arbeit soll nun versucht werden, die Antigenstruktur dieser nicht löslichen Komponenten anhand einiger Typen der Untergruppe II zu klären.

Dabei sollen einerseits Hämagglutinations-Hemmungstests mit gereinigten Viruspartikeln und leeren Kapsiden, andererseits die Komplementbindungsreaktion mit Viruspartikeln gegen jeweils eine Anzahl von Adenovirus-Immunseren der Serotypen der Untergruppe II ausgeführt werden. Auf diese Weise erhofft man sich einen Aufschluß über die Antigen-Spezifität der serologisch aktiven Oberflächenschicht der Viruspartikel und der dort wirksamen Teilkomponenten.

II. Material und Methode

1) Pufferlösungen

a) McIlvaine-Puffer: Lösung A: 35,6 g $Na_2HPO_4 x\ 2H_2O$ werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Lösung B: 21,9 g Citronensäure werden ebenfalls in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Stammpuffer: Lösung A und Lösung B werden so miteinander gemischt, daß ein pH-Wert von 7,2 entsteht. Zum Gebrauch werden 2 ml Stammpuffer mit 98 ml o,85 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

b) Veronalpuffer zur Komplementbindungsreaktion:
Lösung A: 0,2 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 1,0 g $MgCl_2 x\ 6H_2O$ und 4,6 g 5,5- Diäthylbarbitursäure werden zusammen mit 1,0 g Gelatine in 500 ml Aqua bidestillata kurz aufgekocht.
Lösung B: 2,52 g $NaHCO_3$ und 83,80 g NaCl werden mit 3,0 g 5,5- Natriumdiäthylbarbiturat in kaltem Aqua bidestillata gelöst. Stammpuffer: Lösung A und Lösung B werden zusammengegeben und auf 1000 ml aufgefüllt. Zum Gebrauch wird die Stammlösung zehnfach verdünnt. Der pH-Wert liegt dann zwischen 7,2 und 7,4.

c) Alsever'sche Lösung: in 100 ml Aqua bidestillata werden einzeln gelöst: 2,o5 g Traubenzucker, 0,8 g Natriumcitrat, 0,42 g Natriumchlorid, 0,055 g Citronensäure. Die fertige, sterile Lösung hat einen pH von 6,1.

2. Virus-Antigene

Die Prototypstämme der Adenovirustypen (9,9-15,15,17,19,22,24, 26,30) wurden in HeLa-Zellkulturen vermehrt. Zur Gewinnung der Antigene für die Hämagglutinationshemmung (HAH) erhielten die Kulturen 2 % Kalbsserum im Erhaltungsmedium, dagegen wurden die Antigene (Typen 9,9-15,17,19,26) für die Komplementbindungsreaktion (KBR) aus serumfreien HeLa-Zellkulturen gewonnen. Konzentriertes Antigen erhielten wir durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen und anschließendes Abzentrifugieren des Zelldetritus. Das auf diese Weise erhaltene Rohvirus wurde bei -20° C aufbewahrt.

3) Virusaufarbeitung

a) Frigenbehandlung: Um wirtsspezifische Zellantigene wenigstens

teilweise aus dem Rohvirus zu entfernen, wendeten wir die Behandlung mit Frigen 113 an. Zu diesem Zweck werden gleiche Teile Rohvirus und Frigen 113 in ein Zentrifugenglas gegeben und im Eisbad 1-2 Minuten mit dem Ultraturrax emulgiert. Durch niedertouriges Zentrifugieren über 10 Minuten können die Phasen wieder getrennt werden. Später verzichteten wir bei den für die Komplementbindungsreaktion bestimmten Viren auf die Frigenbehandlung, da sich das serumfreie, gereinigte, frigenisierte Virus als wenig stabil erwies. Vergleichende Untersuchungen mit frigenisiertem und nicht frigenisiertem Virus erbrachten in der Komplementbindungsreaktion und im Infektiositätstest keine eindeutigen Unterschiede.

b) Dichtegradientenzentrifugierung:

α) Zentrifugieren auf Cäsium-Chlorid-Polster: Ein Polster von 1,0 ml Cäsium-Chlorid-Lösung mit einer Dichte von ρ = 1,4 entsprechend einem Brechungsindex von nD = 1,3725 wird mit 3,5 ml Rohvirus überschichtet und anschließend 1 Stunde bei 22.000 Umdrehungen in der Minute mit dem Rotor SW 39 in einer Spinco- L 40- Zentrifuge zentrifugiert.Unmittelbar über dem Polster bilden sich zwei nahe beieinander liegende, aus Virion und Kapsid bestehende Banden, die sich nach vorsichtigem Absaugen des die löslichen Komponenten des Virus enthaltenden Überstandes gewinnen lassen.

β) Isopyknische Gradientenzentrifugation: Bei der isopyknischen Gradientenzentrifugation bildet sich der Dichtegradient erst während des Zentrifugierens aus. Die Auftrennung erfolgt ausschließlich nach der unterschiedlichen Dichte der Makromoleküle.

Das bei der Zentrifugierung auf ein Cäsium-Chlorid-Polster gewonnene, jedoch noch nicht getrennte Virion und Kapsid wird mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung auf 4 ml aufgefüllt und mit festem Cäsium-Chlorid auf eine optische Refraktion von nD = 1,365 eingestellt. Hieran schließt sich ein zwanzigstündiger Zentrifugiervorgang bei +4° C und 35.000 Umdrehungen in der Minute an. (Wir verwendeten wieder den horizontal schwingenden Rotor SW 39 in einer Spinco- L 40- Zentrifuge). In der Dichtegradientenzentrifugation werden Virion- und Kapsidbande so weit voneinander getrennt, daß sie einzeln gewonnen werden können.

Die Virion- und Kapsidbanden wurden im Cellophan-Dialyseschlauch gegen physiologische Kochsalzlösung über 24 Stunden dialysiert. Die Kochsalzlösung wurde in dieser Zeit dreimal gewechselt.
Bei den für die KBR bestimmten Viren wurde dem ersten Cäsiumchloridgradienten ein zweiter angeschlossen, um die serologisch aktiven löslichen Komponenten, insbesondere das gruppenreaktive Hexon möglichst weitgehend zu entfernen. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben. Zur Stabilisierung der gereinigten Viria setzten wir diesen Rinderalbumin mit einer Endkonzentration von 0,02 % zu.

4) Immunseren
Wir verwendeten früher hergestellte Kaninchen-Immunseren. Dabei waren Kaninchen mit Virusantigen aus kälberserumfreien HeLa-Zellkulturen bzw. Schilddrüsengewebekulturen intravenös immunisiert worden. Sowohl in der HAH als auch in der KBR wurden pro Virustyp mindestens zwei Immunseren getestet. Außerdem benutzten wir ein in unserem Labor hergestelltes HeLa-Antiserum. Bei der KBR kamen zudem noch Komponenten-Antiseren zur Anwendung, die durch intravenöse Immunisierung von Kaninchen mit gereinigten Adenoviruskomponenten der Typen 15 und 19 erhalten worden waren.

5) Menschenseren
Wir verwendeten Seren, die bei der KBR in der Routinediagnostik einen hohen Titer gegen Adenovirus-Gruppenantigen aufwiesen. Verwendet wurden 4 Antikörpereinheiten.

6) Hämagglutination und Hämagglutinationshemmung
Die Adenoviren der Untergruppe II besitzen die Fähigkeit, Rattenerythrozyten zu agglutinieren. Durch gereinigte Immunseren läßt sich diese Reaktion hemmen. Die Durchführung der HAH erfolgte bei unseren Versuchen nach der Methode von Rosen (Rosen, 1960).
Folgende Reagenzien werden für die Durchführung der HAH benötigt:

a) Ratten-Erythrozyten
b) Immunseren
c) Virusantigen

Zu a:
Mittels perkutaner Herzpunktion wurden Ratten in Äthernarkose 3-5 ml Blut unter Zusatz von gleichem Volumen Alseverscher-Lösung entnommen, das anschließend dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurde. Zum Gebrauch stellten wir die Erythrozyten-Suspension 2 %-ig ein unter Zugabe von 1/20 Vol Kaninchen-Normalserum, das zuvor an Ratten-Blutkörperchen adsorbiert worden war. Für die HAH verwendeten wir eine 2 %-ige Blutkörperchen-Suspension ohne Kaninchen-Normalserum.
Zu b:
Um heterospezifische Agglutinine aus den Seren zu entfernen, wurden die Seren zweimal mit Ratten-Blutkörperchen absorbiert.
Zu c:
Als hämagglutinierendes Antigen verwendeten wir gereinigtes Virion und Kapsid aus dem CsCl-Gradienten. Eine Dialyse war nicht erforderlich. Zur Durchführung der HAH muß das Antigen im Hämagglutinationstest (HA) austitriert werden.
In Hämagglutinationsplatten aus Plexiglas mit runden Vertiefungen stellten wir von den Adenoantigenen der Untergruppe II, ausgehend von einer Anfangsverdünnung von 1:8, Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 her. Als Verdünnungsmedium diente eine Vorlage von 0,4 ml McIlvaine-gepufferter 0,9 %-iger Kochsalzlösung. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,2 ml Ratten-Erythrozyten-Suspension einpipettiert und mit dem Antigen sowie dem Verdünnungsmedium durchmischt. Die Platten wurden erschütterungsfrei für 60-90 Min. bei Zimmertemperatur gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit ließ sich das Sedimentationsbild (pattern) ablesen, indem von 0 (Freie Sedimentation) bis 4 (vollständige Agglutination) skaliert wurde. Wie üblich galt als Endpunkt die Virusverdünnung mit dem pattern 1 (In dieser Verdünnungsstufe ist eine hämagglutinierende Einheit enthalten).

Beim HAH-Test wurden zunächst die Seren in einer Konzentration von 1:20 ausgetestet. Nach diesem Vorversuch stellten wir von einzelnen Seren Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 zur Titerbestimmung her. Als Verdünnungsmedium diente wiederum McIlvaine-gepufferte physiologische Kochsalzlösung.

Zu je 0,2 ml Serum gaben wir 0,2 ml Antigen, das in diesem Volumen 4 hämagglutinierende Einheiten enthielt. Nach gründlichem Mischen ließen wir die beiden Reaktionspartner etwa 15 Min aufeinander einwirken. Dann wurden o,2 ml 2%-ige Ratten-Erythrozyten-Suspension zugesetzt. Nach erneutem gründlichem Mischen blieben die Platten 60-90 Min. stehen, wonach sie abgelesen wurden. Bei allen Versuchen ließen wir eine Serumkontrolle (ohne Virus) und eine Viruskontrollreihe (ohne Serum) mitlaufen.

7) Komplementbindungsreaktion

Die KBR führten wir nach der Mikromethode von Fulton und Dumbell in der Modifizierung von Wigand (1956) durch. Hiernach bleiben Serum- und Antigenmengen konstant, dagegen die Komplementmenge variabel. Die Komplementverdünnungsreihen werden mit dem Faktor 1,6 (logarithmisch 0,2) hergestellt.
Folgende Reagenzien werden zur KBR benötigt:

a) Immunseren
b) Antigen
c) Komplement
d) Hammel-Blutkörperchen
e) Hämolytischer Amboceptor

Zu a:
Die von uns gebrauchten Kaninchen-Immunseren wurden 1:10 in Veronalpuffer verdünnt. Wir verwendeten sie entweder in der o.a. Konzentration oder in der Verdünnung 1:20. Außerdem wurde jeweils mindestens ein Menschen-Serum mitgetestet.
Zu b:
Als Antigen diente serumfreies, in der Regel zweimal cäsiumchlorid-gereinigtes und dialysiertes Virion.
Zu c:
Als Komplement diente Meerschweinchen-Normalserum, das im Eisbad gewonnen und bei -70 $^{\circ}$ C gelagert worden war.
Zu d:
Durch Venenpunktion gewonnenes Hammelblut wurde durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert und durch Zusatz der vierfachen Menge Alseverscher-Lösung haltbar gemacht. Die für die KBR be-

nötigte Menge wuschen wir jeweils dreimal mit Veronalpuffer aus und stellten uns die Erythrozyten-Suspension 10 %-ig ein.
Zu e:
Wir benutzten einen hämolytischen Amboceptor der Behringwerke, den wir zum Gebrauch 1:100 verdünnten: 1 ml Amboceptor + 1 ml Glycerin (DAB 6) + 94 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung + 4 ml 5 %-ige Phenol-Kochsalzlösung.
Bei den Versuchsreihen wurden die gleichen Platten wie bei der HAH verwendet.
Mittels einer Tropfpipette mit 0,02 ml Tropfenvolumen gaben wir Antigen. Serum und Komplement zusammen. Vor Hinzugabe des hämolytischen Systems ließen wir die Reaktionspartner mindestens 16 Stunden bei +4° C aufeinander einwirken und setzten nach Ablauf der Reaktionszeit pro Cup 1 Tropfen hämolytisches System zu. das aus 1 Teil 10 %-iger Hammel-Erythrozyten-Suspension. 1 Teil hämolytischem Amboceptor 1:100 und 18 Teilen Veronalpuffer bestand und das vor dem Zutropfen während etwa 15 Min. wiederholt geschüttelt worden war. Anschließend wurden die Platten 1 1/2 - 2 Stunden im Brutschrank bei 37 ° C inkubiert. Um eine gleichmäßige Durchwärmung zu sichern, wurden nicht mehr als 3 Platten plus 1 Abdeckplatte übereinander gestapelt.
Nach der Entnahme aus dem Brutschrank ließ sich durch leichtes seitliches Beklopfen der Platten die Konglutination der nicht lysierten Erythrozyten erreichen. Die Ablesung erfolgte durch Abschätzung der 50 %-igen Hämolyse (auf 0,05 log mm^3 Komplement).
Den Verbrauch an gebundenem Komplement berechneten wir mit der Formel

$$T = \frac{(SA)-(S)-(A)+(K)}{K}$$

als Anzahl der gebundenen Komplementeinheiten (nach Wigand,1956).
Dabei bedeuten:
(SA) für die 50 %-ige Hämolyse benötigte Komplementmenge in Gegenwart von Antigen und Antikörper,
(S) desgleichen in Gegenwart von Antiserum allein (Serumkontrolle),
(A) desgleichen in Gegenwart von Antigen und Meerschweinchen-Normalserum (Antigenkontrolle),
(K) desgleichen in Gegenwart von Meerschweinchen-Normalserum

(T) den Titer (Zahl der gebundenen Komplementeinheiten).

Die KBR wurde dann als positiv gewertet, wenn unter Berücksichtigung der Kontrollen mindestens 2 50 %-hämolytische Einheiten Komplement gebunden wurden (log T = 0,3).
Um die Konzentration des Antigens für den Hauptversuch festlegen zu können, in dem das Antigen mit den Antiseren gegen sämtliche Typen der Untergruppe II ausgetestet werden sollte, führten wir einen Vorversuch durch, bei dem wir nur einzelne Seren testeten.
Hierbei stellten wir eine Antigenverdünnungsreihe mit den Faktor 4 her, ausgehend von 1:4 bis zur Endkonzentration von 1:256. Die Antigene wurden im Hauptversuch mit ca. 4 Antigen-Einheiten verwendet.
Sowohl in den Vor- als auch in den Hauptversuchen ließen wir doppelte Serumkontrollen, Komplementkontrollen und Antigenkontrollen mitlaufen.

8) Infektiosität

Alle Viruspräparationen wurden auf Infektiosität getestet. Für die Titration verwendeten wir 3 Tage alte HeLa-Zellkulturen. Von den Viruspräparationen wurden Verdünnungsreihen mit dem Faktor 4 hergestellt, beginnend mit 1:8 und endend mit 1:128. Schwache Viren testeten wir auch unverdünnt. In jeweils zwei Gewebekulturröhrchen wurden pro Verdünnung je 0,2 ml inokuliert; unverdünntes Virus wurde mit je 0,1 ml zugesetzt. Die Entwicklung des CPE beobachteten wir über vier Tage.

III. Ergebnisse

1) Ergebnisse in der Hämagglutinationshemmung mit Viruspartikeln

Die bei der HAH sich ergebenden Kreuzreaktionen mit Viruspartikeln der Untergruppe II und den Immunseren gegen alle Typen dieser Gruppe sind in Tabelle 1 zusammengestellt.
Bei unseren Versuchen zeigten die Typen 9 und 9-15 eine vollständige Kreuzreaktion, jedoch reagierte Typ 9 im Gegensatz zu Typ 9-15 nur mit einem Serum von Typ 8.
Adenovirus 9-15 reagierte hochtitrig mit den Seren der Typen 15, 29 und 33-15, schwach mit jeweils beiden Seren der Typen 10 und 19 sowie mit je einem Serum der Typen 13 und 17. Eine reziproke Beziehung wiesen auch die Typen 15 und 22 auf. Weiterhin reagierte Adenovirus 15 deutlich mit den Seren der Typen 9-15,25,29 und 33-15. Typ 22 zeigte mit einem Serum vom Typ 17 eine schwache Kreuzreaktion. Typ 17 reagierte schwach mit einem vom Typ 19. Der Typ 17 wurde nur unvollständig untersucht, da nicht ausreichend hämagglutinierendes Material erhalten werden konnte. Adenovirus 19 kreuzte jeweils mit beiden Typ 10- und Typ 17-Seren und mit jeweils einem Typ 8- und Typ 25-Serum. Typ 24 wies keinerlei Kreuzreaktionen auf: es war das einzige rein typenspezifisch reagierende Virion. Adenovirus 26 zeigte außer homotypischer Reaktion eine schwache Reaktion mit einem Typ 13-Serum. Während Adenovirus 30 mit beiden Typ 13-Seren eine deutliche Kreuzreaktion aufwies, war seine Reaktion mit den Seren von Typ 26 mit nur einem sehr niedrigen Titer festzustellen.

2) Ergebnisse der Hämagglutinationshemmung mit leeren Kapsiden

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der HAH mit Kapsiden der Untergruppe II und den Kaninchen-Immunseren der Typen dieser Gruppe aufgeführt. Auf eine Austitration der Seren mußte in vielen Fällen verzichtet werden, da es bei mehreren Typen schwierig war, genügend hämagglutinierendes Kapsidmaterial zu erhalten. Im wesentlichen fanden sich gleiche Kreuzreaktionen wie bei den Viria, jedoch waren die Titer allgemein 1-3 Stufen niedriger. Gleiche Reaktionen beobachteten wir bei den Typen 9,22 und 24.

Einige Unterschiede ergaben sich bei den übrigen Typen: Alle mit Typ 15-Virion beobachteten Kreuzreaktionen traten auch mit Typ 15-Kapsid auf, hinzu kam die HAH durch ein Serum des Types 23. Typ 17- und Typ 26-Kapsid reagierten im Gegensatz zu ihren Viria nur mit ihren homologen Seren. Typ 19 brachte gleiche Ergebnisse mit den Seren der Typen 10 und 25. Durch die Seren der Typen 8 und 17 fand keine HAH statt. Bei Typ 9-15 waren die Reaktionen gleichartig mit Seren der Typen 8,9,15 und 33-15. Einige mit dem Virion von Typ 9-15 schwach positive Reaktionen waren bei Verwendung von Kapsid nicht zu beobachten. Des weiteren reagierte er nur noch mit jeweils einem Serum der Typen 19 und 29 positiv. Zusätzlich trat eine Kreuzung mit einem Serum des Typs 25 auf.

3) Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion mit Virion

a) Aufarbeitung und Nachweis der serologischen Reinheit:
Hier war zunächst die Frage zu prüfen, ob die Viruspartikel als Träger der gruppenspezifischen Hexon-Komponente selbst gruppenspezifisch reagieren, was sich in einer positiven KBR mit allen Kaninchen-Immunseren und ebenfalls mit Antikörper-haltigen Humanseren hätte zeigen sollen. Es sei vorweggenommen, daß dies nicht der Fall war.
Jedoch war es notwendig, die Reinigung des Virions soweit voranzutreiben, daß weder serologisch nachweisbares HeLa-Zellmaterial noch lösliche Antigene in der Präparation vorhanden waren. Da das gruppenspezifische Hexonantigen in größerer Menge vorkommt, eignet sich die gruppenspezifische KBR mit Humanseren besonders gut zur Überwachung der Reinigung, ebenso wie die KBR mit einem Anti-HeLa-Immunserum.
Das Verhalten dieser Antigene bei den in der Methodik beschriebenen Schritten zur Viruspräparation ist in Tab. 3 in einem Beispiel wiedergegeben, bei dem je ein Trennungsvorgang mit unbehandeltem und frigenisiertem Viruskonzentrat vorgenommen wurde. Wie man sieht, ist HeLa-Zellantigen bei nicht frigenisiertem Virus schon nach der Zentrifugation auf ein Polster von Cäsiumchlorid nicht mehr nachweisbar. Frigenisiertes Virus ließ diese wirtsspezifischen Antigene

von Anfang an vermissen.
Gruppenspezifisches Antigen ist nach der ersten Dichtegradienten-Zentrifugierung noch deutlich nachweisbar und verschwindet erst nach der zweiten vollständig; demnach sind für diesen Zweck jeweils zwei sukzessive Dichtegradienten-Zentrifugiervorgänge notwendig. Hierbei tritt allerdings ein erheblicher Verlust an Infektiosität (rund 90 %, s. letzte Spalte der Tab. 3) ein, und auch das typenspezifische Antigen, dessen Ausgangstiter wegen der Überlagerung mit der Gruppenreaktion nicht zu ermitteln ist, sinkt erheblich ab.
Die Frigenbehandlung führte zu einer wesentlichen Einbuße an Antigen, was sich mit früheren Erfahrungen deckt (Wigand et al., 1966); sie scheint außerdem die Stabilität der Viruspräparationen nachteilig zu beeinflussen und ist somit für den vorgesehenen Zweck nicht geeignet oder notwendig.

In diesem Zusammenhang sei noch die Wirkung längerer Aufbewahrung gereinigter Viruspräparationen auf Infektiosität und Kreuzungsverhalten in der KBR beschrieben. Aus Tab. 4 ist ersichtlich, daß nach längerem Aufbewahren des gereinigten Virions die Infektiosität schwindet; gleichzeitig steigt die Zahl der heterolog positiven Ergebnisse in der KBR mit Kaninchen-Immunseren sowie mit Humanseren erheblich an. Dieses Verhalten deutet auf einen Zerfall des Virions hin, bei dem Hexon frei wird, dessen gruppenspezifische Determinante nun zum Tragen kommt.

b) Kreuzreaktionen mit Kaninchen-Immunseren der Untergruppe II:
Trotz mehrfacher Wiederholungen der Versuche konnten in einigen Fällen keine eindeutigen Resultate erzielt werden (sie werden in der Tab. mit $\pm$ gekennzeichnet). Bei der Sicherung der Ergebnisse erwies sich das Arbeiten mit Typ 17 als besonders schwierig, zumal von diesem Typ nur wenig brauchbares Material gewonnen werden konnte. Im Folgenden sollen vorerst die Testergebnisse mit den Immunseren der Untergruppe II aufgeführt werden:
Da die Viria der Typen 9 und 9-15 weitgehend gleiche Ergebnisse aufwiesen, werden ihre Reaktionen gemeinsam besprochen .

Beide Viria zeigten eindeutige positive Reaktionen mit den Seren der Typen 8, 15 und 9-15 bzw. 9. Mit einem der beiden Seren der Typen 10 und 19 fanden sich ebenfalls Kreuzreaktionen. Unklare Ergebnisse erbrachte die KBR mit beiden Seren des Typs 13 sowie mit jeweils einem Serum der Typen 22, 26 und 27. Neben diesen gleichen Reaktionen der Viria der Adenoviren 9 und 9-15 waren jedoch auch unterschiedliche Testergebnisse zu verzeichnen. Typ 9-15 Virion wies auch mit den Seren der Typen 17, 29 und 30 eine positive KBR auf, dagegen waren mit Typ 9-Virion nur mit je einem Serum des Typs 17 und 30 positive Reaktionen zu beobachten. Mit je einem Serum der Typen 17, 29 und 30 erhielten wir unklare Resultate. Zusätzlich ließen sich mit Adenovirus 9-15 positive Reaktionen mit je einem Serum der Typen 20, 23 und 25 erzielen. Die Reaktion mit dem Serum des Typs 28 verlief nicht eindeutig. Komplette Viruspartikel von Typ 15 reagierten mit den Seren der Typen 29 und 30, sowie mit je einem Serum der Typen 17 und 25. Im Gegensatz zur HAH war keine Kreuzreaktion mit den Seren des Typs 22 zu beobachten. Typ 19-Virion ließ die aus der Literatur bekannte Kreuzreaktion (Bell et al., 1960) mit den Typ 10-Seren, die auch wir in der HAH bestätigt fanden, in der KBR vermissen. Es wies dagegen Reaktionen mit einem Serum der Typen 9, 26 und 30 auf. Das Virion von Typ 26 zeigte positive KBR mit den Seren der Typen 19,29 und 30, sowie mit je einem Serum der Typen 13 und 25.
Bei Adenovirus Typ 17 fällt auf, daß es eine verhältnismäßig große Anzahl unklarer Ergebnisse aufwies, wobei sogar eines der drei homologen Seren nicht eindeutig reagierte. Nur in drei Fällen, und zwar mit je einem Serum der Typen 15,27 und 28 konnten wir positive Kreuzreaktionen verzeichnen.

c) Reaktion mit Komponentenseren:
Außer mit Kaninchen-Vollimmunseren wurden die kompletten Viruspartikel in der KBR auch mit Komponenten-Antiseren getestet. Wir wählten hierzu je ein Typ 15-Antihexonserum, ein Typ 19-Antihexonserum, ein Typ 19-Antifiberserum und ein Typ 19-Antivirionserum aus
Die Ergebnisse aus diesen Versuchen gibt die Tabelle 6 wieder.

Mit dem Typ 19-Antivirionserum reagierten außer Typ 19 sämtliche in der KBR getesteten Typen negativ.
Kein Virion ließ mit Typ 19-Antifiberserum eine positive Reaktion erkennen. Die von Gelderblom et al. gezeigten positiven Ergebnisse bei Testung von gereinigtem Virus mit seinem homologen Antifiberserum treten nach ihren Angaben nur bei hohen Viruskonzentrationen auf (Gelderblom et al., 1968).
Mit Typ 19-Antihexonserum reagierten Viria der Typen 9-15, und 19 positiv, Typ 17 negativ und die Typen 9 und 15 nicht eindeutig.
Eine Kreuzreaktion mit Typ 15-Antihexonserum zeigten die Viria der Typen 9,9-15 und 15, negativ reagierten die Typen 19 und 26, unklar blieb das Ergebnis bei Typ 17.

d) Reaktion mit Antikörper-haltigen Humanseren:
Um den Reinheitsgrad der Viruspräparationen von gruppenspezifischem Hexonantigen zu überprüfen, testeten wir die Viria aller Typen gegen Antikörper-haltige Humanseren. Insgesamt wurde gegen 8 Humanseren ausgetestet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 7. Mit den meisten Seren wiesen die Viruspartikel keine positive KBR auf. Je eine bzw. zwei positive Reaktionen der Typen 19 und 15 bzw. 9 und 9-15 dürften auf spezifische Antikörper in den entsprechenden Humanseren zurückzuführen sein.

IV. Diskussion

In Tabelle 8 sind die wesentlichen Ergebnisse aus der HAH und der KBR einander gegenübergestellt. Zusätzlich wurden unveröffentlichte Resultate aus der HAH mit Dodecon der Untergruppe II zum Vergleich eingefügt, die praktisch mit früher beschriebenen, mit ungereinigtem Virus erhaltenen Kreuzreaktionen (Jung und Wigand, 1967; Wigand, 1968) übereinstimmen. Ebenfalls zum Vergleich herangezogen wurden Ergebnisse aus der KBR mit Faserantigen (Meiser et al., 1969) sowie das Verhalten der einzelnen Typen in der Neutralisation (Wigand et al., 1965; Wigand und Fliedner, 1968).

Zunächst muß als bemerkenswert hervorgehoben werden, daß in keinem der mit kompletten und inkompletten Viruspartikeln durchgeführten Tests, vor allem nicht in der KBR mit Virion, eine gruppenspezifische Reaktion beobachtet wurde. Dies bestätigt den elektronenmikroskopischen Befund von Norrby et al. (1969): intaktes Virion vom Typ 3, einem Vertreter der Untergruppe I, zeigte nach Behandlung mit homologem Antihexonserum einen dichten Besatz mit typenspezifischen Antikörpern, wohingegen mit heterologen Antihexonseren keine Reaktion auftrat.
Smith et al. untersuchten bereits 1965 die Agglutinationsreaktion von Adenoviren (Typen 2, 3, 12 und 18) elektronenmikroskopisch. Die Reaktion erwies sich bei Verwendung von Antivirionseren als typenspezifisch. Eine Ausnahme machten allerdings die Typen 12 und 18. Bei Austestung der Typen 1, 2 und 7 gegen Antiseren der Typen 1 bis 18 in der makroskopischen Agglutination ließ sich wiederum Typenspezifität verzeichnen. Außerdem deuteten Smith et al. (1965) an, daß das intakte Virion in der KBR mit Antivirionserum vorwiegend typenspezifisch reagiert, und erst nach Aufbrechen des Viruspartikels eine mehr gruppenspezifische Reaktion zu erwarten sei.
Gleiches Verhalten bezüglich der Typenspezifität konnten wir eindeutig in der KBR mit Komponenten-Antiseren nachweisen: mit dem Antivirionserum des Typs 19 ebenso wie mit dessen Antihexonserum reagierte nur Typ 19 selbst. In unseren Versuchen mit frigenisiertem und nicht frigenisiertem Virus sowie in dem Parallelversuch mit frischem und bei + 4 °C gela-

gertem bzw. gefrorenem und getautem Virion konnten wir zeigen, daß durch Lagerung bzw. Frieren ein Zerfall des Virion eintrat, der zur Zunahme von Kreuzreaktionen in der KBR mit heterologen Seren und Adeno-positiven Humanseren bzw. zu erneutem Titeranstieg mit Rekonvaleszentenseren führte. In diesem Zusammenhang können noch Russell und Knight (1967) angeführt werden, die anhand des Typs 5, einem Vertreter der Untergruppe III, zeigten, daß das intakte Virion nur mit seinem homologen Antihexonserum reagierte und nicht mit Antifiber- oder Antipentonserum. Nach Lagerung bei + 4° C wies das Virion von Typ 5 jedoch aufgebrochene Kapside auf und reagierte in diesem Zustand auch mit Antifiber- und Antipentonseren.
Da das Virion in der KBR hauptsächlich typenspezifisch reagiert (Smith et al., 1965), und die Virion-HAH mit Antihexonserum typenspezifisch ist (Norrby et al., 1969), und auch wir in unseren Versuchen keine gruppenspezifische Reaktion nachweisen konnten, gewinnt die Annahme an Wahrscheinlichkeit, daß die Hexonkomponente innerhalb des Kapsids bzw. des intakten Virion eine spezielle Orientierung haben muß. Das typenspezifische Antigen ε dürfte an der Oberfläche zugänglich sein, während das gruppenspezifische Antigen α der Innenseite zugewendet ist (Norrby, 1968 a; 1969 b).

Die beobachteten Kreuzreaktionen lassen sich in den verschiedenen Tests fast ohne Ausnahme in vier Kategorien einteilen, die in Tabelle 8 jeweils zeilenweise zusammengestellt sind.

1) Kreuzung in allen Tests außer in der Neutralisation,
2) Kreuzung in den drei HA-Hemmungstesten, jedoch keine Kreuzung in der Virion-KBR, die KBR mit Fiber kann vorhanden sein oder fehlen, keine Neutralisation,
3) Kreuzung in der HAH mit Virion und Kapsiden, außerdem in der KBR mit Virion und in der Neutralisation. Dagegen fehlt die HAH mit Dodecon und die KBR mit Fiber.
4) Zusätzliche Reaktionen, die fast ausschließlich in der Virion-KBR zu beobachten waren.

Bevor auf die obigen Reaktionsschemata näher eingegangen wird, ist vorauszuschicken, daß Typ 24 ausschließlich typenspezifisch reagierte. Die Typenspezifität von Typ 24 findet in der Lite-

ratur ihre Bestätigung. Stevens et al., (1967) beschrieben allerdings eine schwache Kreuzreaktion mit Seren des Typs 27 in der Neutralisation. Da die Virion-KBR bei Typ 17 außerordentlich viele unklare Ergebnisse erbrachte, und der Vergleich mit den anderen in Tabelle 8 angeführten Tests Widersprüchlichkeiten aufdeckt, sollte man bei diesem Typ mit der Interpretation weitere Versuche mit besseren Antigenen abwarten.
Sowohl bei Typ 9 als auch bei Typ 9-15 finden sich gleiche Reaktionen in allen Tests mit Ausnahme der Neutralisation. Da allein die Fiberkomponente nicht zur Induktion neutralisierender Antikörper in der Lage ist (Gelderblom et al., 1968), und in der HA hauptsächlich die Fiberkomponente eine Rolle spielt, müssen diese Kreuzreaktionen in der HAH aber auch in der KBR der Fiberkomponente, d.h. dem typenspezifischen Antigen γ zugeschrieben werden, welches im distalen Abschnitt der Fiberkomponente gelegen ist. Die Beziehung der Typen 9 und 9-15 wurde unter Anwendung unterschiedlicher Techniken auf eine enge Verwandtschaft oder Identität der Fiberantigene bei unterschiedlichem Hexon zurückgeführt (Meiser et al., 1969; Wigand und Meiser, 1969; Norrby, 1969 c). Die Antigenbeziehung zwischen Typ 8 und 9 wurde von Hierholzer und Dowdle (1970) grundlegend erforscht. Die Autoren machten wahrscheinlich, daß mehr Determinanten von Typ 8 im Kapsid des Typs 9 inkorporiert seien als umgekehrt. Dies mag auch ein Grund dafür sein, warum in unseren Versuchen das virusassoziierte Hämagglutinin des Typs 9 nur mit e i n e m Serum gegen Adenovirus 8 reagierte. Neben der sehr ähnlichen Fiberkomponente dieser beiden Typen ist jedoch eine Verwandtschaft von Pentonbasis und/oder Hexon nicht auszuschließen.
Ähnlich wie bei den oben besprochenen Typen sieht es bei Adenovirus 19 und 15 aus. Die Verwandtschaft zeigt sich auch hier in erster Linie in der HAH, allerdings fehlen neben den Kreuzreaktionen in der Neutralisation auch solche in der KBR mit Virion(Typ 19 kreuzt nicht mit den Seren der Typen 10, 17 und 25; Typ 15 nicht mit den Seren des Typs 22) oder sogar in der KBR mit Fiberantigen (Typ 15 kreuzt auch hier nicht mit den Seren des Typs 22). Trotz dieser Mängel müssen wir die Kreuzreaktionen dieser Typen einer typenspezifischen Determinante

Im Fiberanteil zuschreiben. Da jedoch der Verwandtschaftsgrad dieser Typen nicht so eng wie bei den Adenoviren 8 und 9 (Hierholzer und Dowdle, 1970) und 9 und 9-15 (Norrby, 1968 b) zu sein scheint, die Fiberkomponente somit nur als ähnlich, nicht aber als identisch anzunehmen ist, sei die Determinante provisorisch als γ' bezeichnet. In diesem Zusammenhang seien noch einmal Gelderblom et al. (1968) erwähnt, die eine positive Reaktion von Virion mit homologem Antifiberserum nur bei sehr hoher Antigenkonzentration nachweisen konnten. Es wäre demnach denkbar, daß bei unserer KBR mit Virion die Antigenkonzentration zu gering war, um eine Reaktion sichtbar zu machen.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Kreuzungsmechanismus finden sich bei den Typen 9-15 und 15 Kreuzungen, die ausschließlich in der HAH mit Virion und leeren Kapsiden, in der KBR mit Virion sowie in der Neutralisation auftreten, in der HAH mit Dodecon und in der KBR mit Fiber jedoch fehlen. So finden sich Kreuzungen der Typen 9-15 und 15 mit den Seren der Typen 15 bzw. 9-15, 25, 29 und 33-15 in der Virion- und Kapsid-HAH wie in der Virion-KBR. Ein gleiches Reaktionsschema liegt bei Typ 30 mit den Seren des Typs 13 vor, jedoch verfügen wir in diesem Fall nur über Befunde aus der HAH mit Virion und der Neutralisation. Da erwiesenermaßen das Hexonantigen neutralisierende Antikörper induziert (Wilcox und Ginsberg, 1963; Kjellen und Pereira, 1968; Gelderblom et al., 1968), müssen diese Kreuzungen der typenspezifischen Determinante ε des Hexons zugeschrieben werden, welches demnach - wie bereits erwähnt - auf der Oberfläche des intakten Virions verfügbar sein muß. Zudem reagieren die Fiberkomponenten in der KBR negativ ebenso wie das Dodecon, welches ja kein Hexon enthält, in der HAH. Das unterschiedliche Verhalten des virusassoziierten und des löslichen Hämagglutinins in der HAH, welches 1966 von Wigand und Wunn erstmals beschrieben wurde, wird jetzt als sterische Behinderung des Fiberantigens infolge Anlagerung von IgG an die Hexonkapsomeren des Virions verständlich (Norrby 1969 a, 1969 b; Norrby et al., 1969).
Unsere Befunde mit Antihexonseren (s. Tabelle 6) passen insoweit dazu, als diese Seren weitgehend die gleichen Kreuzreaktionen wie die Vollseren der betreffenden Typen in der KBR zeigen.

Insbesondere reagiert Typ 15-Antihexonserum mit dem Virion des Typs 9-15.
Entgegen den Befunden von Gelderblom et al. (1968) und Norrby (1969 a , 1969 b) u.a. Autoren fanden Petterson et al. (1967) keine neutralisierende Aktivität in Antihexonseren und sprachen der Hexonkomponente, die sie ausgiebig gereinigt hatten, auch die Typenspezifität ab. In einer 1971 erschienenen Veröffentlichung kommen aber auch Petterson et al. zu gleichen Ergebnissen wie die oben genannten Autoren.
Neben diesen klar deutbaren Ergebnissen finden sich aber auch Reaktionen - vor allem in der KBR mit Virion - die weder der Hexon- noch der Fiberkomponente (ε, γ oder γ') zugeschrieben werden können. Möglicherweise handelt es sich hier um untergruppenspezifische Reaktionen, bei welchen insbesondere Typ 30- Immunseren, aber auch Typ 17- Immunseren die zugehörigen Antikörper enthalten. Sowohl für die Hexon- als für die Fiberkomponente wird Untergruppenspezifität angenommen (Norrby, 1968 a, 1969 a). Norrby und Wadell (1972) fanden kürzlich auf der Virusoberfläche "antigenic sites", die untergruppenspezifisch zu sein scheinen und wahrscheinlich in den Scheitelkapsomeren lokalisiert sind. Eventuell sind die nicht eindeutig zuordbaren Ergebnisse in der KBR mit Virion auf Reaktionen mit solchen " antigenic sites " zurückzuführen. Andererseits könnte auch eine Reaktion mit Hexon oder Fiber vorliegen.
Die in der HAH gefundenen Unterschiede zwischen Viruspartikeln und leeren Kapsiden (s. Tabelle 1 und 2) sind geringfügig und erlauben keinen Hinweis auf einen Antigenunterschied.

In Anbetracht unserer Ergebnisse und der in der Literatur veröffentlichten Erfahrungen kann für die kompletten und inkompletten Viruspartikel der Untergruppe II vor allem Typenspezifität angenommen werden. Eine zusätzlich mögliche untergruppenspezifische Reaktion bedarf einer weiteren Abklärung. Nach Norrby und Wadell (1969) ist außerdem noch eine Intersubgruppen-Spezifität zwischen den Untergruppen II und III wahrscheinlich. Sie fanden z.B. in einem Antihexonserum des Typs 15, welches mit Hexon der Typen 3 bzw. 11 absorbiert worden war, Antikörper gegen Mitglieder der Untergruppe II und III. Diese Art der Spezifität wurde in unseren Untersuchungen jedoch nicht berücksichtigt.

V. Zusammenfassung

Komplette und inkomplette Viruspartikel von Adenoviren der Untergruppe II (Typ 9, 9-15, 15, 19, 26, 17, 22, 24 und 30) wurden gereinigt und im Hämagglutinations-Hemmungstest gegen Kaninchen-Immunseren aller Typen der Untergruppe II getestet. In der Komplementbindung wurden außerdem die kompletten Viruspartikel der erstgenannten 6 Typen mit diesen Seren und mit Antiseren gegen Adenovirus-Komponenten untersucht. Eine gruppenspezifische Reaktion fand sich nicht. Die auftretenden Kreuzreaktionen wurden mit γ, γ', ε und "andere" bezeichnet (s. Tabelle 8). Die durch γ und γ' bedingten Kreuzreaktionen sind wahrscheinlich durch gleiche oder ähnliche Determinanten im Fiberantigen bedingt, während ε der typenspezifische Anteil des Hexons ist. Die Lokalisation des oder der "anderen" Antigene, die sich nur in der Komplementbindung mit Virionantigen nachweisen ließen, ist unbekannt. Komplette und inkomplette Partikel unterschieden sich nicht wesentlich in ihren Kreuzreaktionen bei der Hämagglutinations-Hemmung.

VI. Literaturverzeichnis

1) Bauer, H. und Wigand, R.: Eigenschaften der Adenovirus-Hämagglutinine. Z.Hyg. 144, (1963): 96-113

2) Bauer, H., Wigand, R. und Adam, W.: Lösliche und virusgebundene Adenovirus Hämagglutinine. Z.Naturforsch. 19 b, (1964): 587-593

3) Bell, S.D., Rota, T.R. and McComb, D.E.: Adenoviruses isolated from Saudi Arabia. III. Six new serotypes. Amer.J.trop.Med.Hyg. 9, (1960): 523-552

4) Enders, J.E., Bell, J.A., Dingle, H.J., Francis, T.Jr., Hillmann, M.R., Huebner, R.J. and Payne, A.M.-M.: 'Adenoviruses': a group name proposed for new respiratory-tract viruses. Science 124, (1956): 110

5) Gelderblom, H., Bauer, H., Frank, H.and Wigand, R.: The structure of group II adenoviruses. J.gen.Virology 1, (1967): 553-560

6) Gelderblom, H., Meiser, W., Lengyel, A. and Wigand, R.: The serological relationship of the soluble antigens of adenovirus type 19. J.gen.Virology 2, (1968): 331-340

7) Ginsberg, H.S., Pereira, H.G., Valentine, R.C. and Willcox, W.C.: A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. Virology 28, (1966): 782-783

8) Hierholzer, J.C. and Dowdle, W.R.: Immunological basis of the adenovirus 8-9 cross-reaction. J.of Virology 6, (1970): 782-787

9) Jung, D. and Wigand, R.: Epidemiology of group II adenoviruses. Amer.J.Epidemiol. 85, (1967): 311-319

10) Kjellen, L. and Pereira, H.G.: Role of adenovirus antigens in the induction of virus neutralizing antibody. J.gen.Virology 2, (1968): 117

11) Liem, I.T.F., Kron, I.und Wigand, R.: Dodecon, das lösliche Hämagglutinin bei allen Adenoviren der Untergruppe II. Arch.ges.Virusforsch. 33, (1971): 177-181

12) Meiser, W., Lange, J.,Loytved, D. und Wigand, R.: Typenspezifische Adenovirus-Antigene. Arch.ges.Virusforsch. 26, (1969): 355-365

13) Norrby, E.: The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I.Morphological characteristics. Virology 28, (1966): 236-248

14) Norrby, E.: Biological significance of structural adenovirus components. Current Topics in Microbiol. and Immunol. 43, (1968 a): 1-43

15) Norrby, E.: Comparative studies on the soluble components of adenovirus type 9 and 15 and the intermediate strain 9-15. J.of Virology 2, (1968 b): 1200-1210

16) Norrby, E.: The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. J.gen.Virology 5, (1969 a): 221- 236

17) Norrby, E.: The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV.Immunological complexity of soluble components. Virology 37, (1969 b): 565- 576

18) Norrby, E.: Capsid mosaics of intermediate strains of human adenoviruses. J.of Virology 4, (1969 c): 657-662

19) Norrby, E., Marusyk, H. and Hammarsköld, M.L.: The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. V.Identification of antigen specifities available at the surface of virions. Virology 38, (1969): 477-482

20) Norrby, E. and Wadell, G.: Immunological relationship between hexons of certain human adenoviruses. J.of Virology 4, (1969): 663-670

21) Norrby, E. and Wadell, G.: The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type3. VI.Further characterization of antigenic sites available at the surface of virions. Virology 48, (1972): 757-765

22)Pereira, H.G., Huebner, R.J., Ginsberg, H.S. and van der Veen, J.: A short description of the adenovirus group. Virology 20, (1963): 613-620

23) Petterson, U., Philipson, L.and Höglund, S.: Structural proteins of adenoviruses. I. Purification and characterization of the adenovirus type 2 hexon antigen. Virology 33, (1967): 575-590

24) Petterson, U.: Structural proteins of adenoviruses. VI. On the antigenicsdeterminants of the hexon. Virology 43, (1971): 123-136

25) Rosen, L.: A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. Amer.J.Hyg. 71, (1960): 120-128

26) Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parott, R.H. and Ward, T.G.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 84, (1953): 570

27) Russell, W.L. and Knight, B.E.: Evidence for a new antigen within the adenovirus capsid. J.gen. Virology 1, (1967): 523-528

28) Smith, K.O., Trousdale, M. and Gehle, W.: Adenovirus-antibody agglutination-reactions. J.Immunology 95, (1965): 810-817

29) Stevens, D.A., Schaeffer, M., Fox, J.P., Brandt, C.D. and Romano, M.: Standardization and certification of reference antigens and antisera for 30 human adenovirus serotypes. Am.J.of Epidemiol. 86, (1967): 617-633

30) Valentine, R.C. and Pereira, H.G.: Antigens and structure of the adenovirus. J.Molec.Biol. 13, (1965): 13-20

31) Wadell, G.: Structural and biological properties of capsid components of human adenoviruses. Stockholm 1970

32) Wadell, G. and Norrby, E.: Immunological and other biological characteristics of pentons of human adenoviruses. J. of Virology 4, (1969): 671-680

33) Wigand, R.: Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Z.Hyg. 143, (1956): 188-214

34) Wigand, R.: Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Arch. ges.Virusforsch. 23, (1968): 40-47

35) Wigand, R.: Infektionen durch Adenoviren. In: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. Bd 2. Hg.: A.Grumbach und W. Kikuth. 2., neubearb.u.erw.Aufl. Stuttgart 1969. S. 1462-1482

36) Wigand, R.: Adenovirusstämme der Untergruppe II mit ungewöhnlichen serologischen Eigenschaften. Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 155, (1970): 235-240

37) Wigand, R., Bauer, H., Lang, F. and Adam, W.: Neutralization of the adenoviruses types 1 to 18: Specificity and antigenic relationships. Arch.ges.Virusforsch. 15, (1965): 188

38) Wigand, R. and Fliedner, D.: Serologically intermediate adenovirus strains: A regular feature of group II adenoviruses. Arch.ges.Virusforsch. 24, (1968): 245-256

39) Wigand, R. and Meiser, W.: Neutralization of adenoviruses by component antisera. Arch.ges. Virusforsch. 27, (1969): 112-114

40) Wigand, R. and Wunn, W.: Virus-associated and soluble adenovirus hemagglutinins: Differences in antigenic specificity. Virology 28, (1966): 484

41) Wigand, R., Wunn, W., Schmidt, W.A.K. und Gelderblom, H.: Verfahren zur Trennung von Adenovirus-Antigenen. Arch.ges.Virusforsch. 19,(1966): 320-333

42) Wilcox, W.C. and Ginsberg, H.S.: Production of specific neutralizing antibody with soluble antigens of type 5 adenovirus. Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.) 114, (1963): 37

Tabelle 1: Hämagglutinationshemmung: Kreuzreaktionen von Viruspartikeln der Untergruppe II mit Kaninchen-Immunseren

Immunserum		Antigen Typ								
Typ	Nr.	9	9-15	15	17	19	22	24	26	30
8	394	-	40	-	-	80	-	-	-	-
	395	640	80	-	-	-	-	-	-	-
9	322	640	320	-	-	-	-	-	-	-
	323	640	2560	-	-	-	-	-	-	-
10	342	-	20	-		80	-	-	-	-
	343	-	20	-		320	-	-	-	-
13	644	-	-	-	-	-	-	-	40	160
	645	-	-	-	-	-	-	-	-	640
15	346	-	160	80	-	-	40	-	-	-
	349	-	80	640		-	40	-	-	-
17	117	-	40	-	80	80	-	-	-	-
	118	-	-	-	80	160	40	-	-	-
19	514	-	20	-	20	160	-	-	-	-
	515	-	40	-		160	-	-	-	-
20	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	886	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	388	-	-	80	-	-	80	-	-	-
	393	-	-	160	-	-	80	-	-	-
23	883	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	884	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	14	-	-	-	-	-	-	640	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	640	-	-
25	8	-	-	160	-	160	-	-	-	-
	10	-	-	40	-	-	-	-	-	-
26	390	-	-	-	-	-	-	-	80+	20
	81	-	-	-	-	-	-	-	80+	20
27	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	397	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	199	-	320	640	-	-	-	-	-	-
	200	-	80	160	-	-	-	-	-	-
30	197	-	-	-	-	-	-	-	-	80+
	198	-	-	-	-	-	-	-	-	80+
33-15	121	-	320	640	-	-	-	-	-	-
	122	-	160	640	-	-	-	-	-	-
34-20	175	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	176	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-15	63	80+	1280	320						
	64	80+	640	320						

\- = 1:20

Hervorgehobene Zahlen: Keine Kreuz-HAH mit Dodecon

Tabelle 2: Hämagglutinationshemmung: Kreuzreaktionen von leeren Kapsiden der Untergruppe II mit Kaninchen-Immunseren

Immunserum		Antigen Typ							
Typ	Nr.	9	9-15	15	17	19	22	24	26
8	394	-	+	-	-	-	-	-	-
	395	+	+	-	-	-	-	-	-
9	322	+	+	-	-	-	-	-	-
	323	+	+	-	-	-	-	-	-
10	342	-	-	-	-	+	-	-	-
	343	-	-	-	-	+	-	-	-
13	644	-	-	-	-	-	-	-	-
	645	-	-	-	-	-	-	-	-
15	346	-	+	+	-	-	+	-	-
	349	-	+	+	-	-	+	-	-
17	117	-	+	-	+	-	-	-	-
	118	-	-	-	+	-	+	-	-
19	514	-	-	-	-	+	-	-	-
	515	-	+	-	-	+	-	-	-
20	15	-	-	-	-	-	-	-	-
	886	-	-	-	-	-	-	-	-
22	388	-	-	+	-	-	+	-	-
	393	-	-	+	-	-	+	-	-
23	883	-	-	-	-	-	-	-	-
	884	-	-	+	-	-	-	-	-
24	14	-	-	-	-	-	-	+	-
	17	-	-	-	-	-	-	+	-
25	8	-	+	+	-	+	-	-	-
	10	-	-	+	-	-	-	-	-
26	390	-	-	-	-	-	-	-	+
	81	-	-	-	-	-	-	-	+
27	13	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-
28	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	397	-	-	-	-	-	-	-	-
29	199	-	-	+	-	-	-	-	-
	200	-	+	+	-	-	-	-	-
30	197	-	-	-	-	-	-	-	-
	198	-	-	-	-	-	-	-	-
33-15	121	-	+	+	-	-	-	-	-
	122	-	+	+	-	-	-	-	-
34-20	175	-	-	-	-	-	-	-	-
	176	-	-	-	-	-	-	-	-
9-15	63	+	+	+					
	64	+	+	+					

+ = Eindeutige HA-Hemmung, Mindesttiter 1:20

Hervorgehobene +: Keine Kreuz-HAH mit Dodecon

Tabelle 3: Komplementbindung beim Reinigungsvorgang von Adenovirus 19.

Material	Menge (ml)	KBR mit			Infektiosität *
		homologem Immunserum	Humanserum	Anti-HeLa-serum	
Ausgangsmaterial	10	256+	128	8	320
Ausgangsmaterial, frig. **	10	64+	64	2	80
Überstand nach CsCl-Polster	10	64+	64	2	<10
Überstand nach CsCl-Polster, frig.	10	64+	64	<1	<10
Virusbande nach 1. CsCl-Grad.	2	64	8	<1	32
Virusbande nach 1. CsCl-Grad., frig.	2	16	8	<1	16
Virusbande nach 2. CsCl-Grad.	3	8	<1	<1	24
Virusbande nach 2. CsCl-Grad., frig.	3	4	<1	<1	12

* Infektiöse Einheiten, bezogen auf Ausgangsvolumen
** Vor Aufarbeitung mit gleichen Teilen Frigen 113 behandelt

Tabelle 4: Vergleich zwischen frischem und gelagertem Typ 15-Virion hinsichtlich seiner Kreuzreaktionen mit Kaninchen-Immunseren und Human-Seren in der KBR und seines Verhaltens im Infektiositätstest.

Seren	Antigen	KBR pos.	KBR fragl.	KBR neg.	gesamt
heterologe Kaninchen-Immunseren	frisch	15	7	16	38
	gelagert	31	2	5	38
Antikörper-haltige Humanseren	frisch	1	ø	2	3
	gelagert	3	ø	ø	3
Infektio-sität	frisch	1:16			
	gelagert	<1:1			

Tabelle 5: Komplementbindungsreaktion:
Kreuzreaktionen von Viruspartikeln mit Kaninchen-Immunseren

Immunseren		Antigen-Typ					
Typ	Nr.	9	9-15	15	19	26	17
8	394	+	+	-	-	-	±
	395	+	+	-	-	-	±
9	322	+	+	-	-	-	±
	323	+	+	-	-		
	105	+	+		+	-	-
10	342	-	-	-	-	-	-
	343	+	+	-	-	-	-
13	644	±	±	-	-	-	-
	645	±	±	-	-	+	-
15	346	[+]	+	+	-	-	+
	349	[+]	+	+	-		-
	108			+	-	-	
17	117	[±]	[+]	+	-	-	±
	118	[+]	[+]	-	-	-	+
19	514	+	+	-	+	[+]	±
	515	-	-	-	+	[+]	-
20	15	-	+	-	-	-	-
	886	-	-	-	-	-	-
22	388	-	-	-	-	-	-
	393	±	±	-	-	-	-
23	883	-	-	-	-	-	-
	884	-	+	-	-	-	-
24	14	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	±
25	8	-	+	-	-	[+]	±
	10	-	-	+	-	-	±
26	390	-	-	-	-	+	-
	81	±	±	-	+	+	-
27	13	-	-	-	-	-	[+]
	18	±	±	-	-		±
28	397	-	±	-	±	-	[+]
29	199	±	+	+	-	[+]	±
	200	-	+	+	-	[+]	±
30	197	[±]	[+]	[+]	[±]	[+]	-
	198	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	±
9-15	109	+	+				

± : Bei wiederholten Versuchen schwach oder wechselnd positiv.
[+] : Keine Kreuzreaktion in anderen Tests.

Tabelle 6: Kreuzreaktion von Viruspartikeln der Untergruppe II in der KBR mit verschiedenen Adenovirus-Komponenten-Antiseren

Antiserum gegen	Virion-Antigen Typ				
	9	9-15	15	19	26
15 Hexon	+	+	+	-	-
19 Hexon	±	+	±	+	
19 Fiber	-		-	-	-
19 Virion	-	-	-	+	-

Tabelle 7: Komplementbindungsreaktion: Kreuzreaktionen von Viruspartikeln mit Antikörper-haltigen Humanseren

Seren	Antigen - Typ					
	9	9-15	19	15	17	26
I	±		+			
II	+	+	-	-	-	-
III	+	+	-		-	
IV	-	-	-	-		
V	-	-	-			
VI	-			+		
VII		-	-	-		
VIII		-	-	-		

Tabelle 8: Serologische Spezifität der Kreuzreaktionen bei Vergleich verschiedener Testmethoden und Antigene

Adenovirus Typ a.	Spezifität	Immunseren mit Kreuzreaktion in dem angegebenen Test					
		HAH Virion	HAH Kapsid	HAH Dodecon	KBR Virion	KBR Fiber[b.]	Neutralisation[c.]
9	γ	9-15,(8)[d.]	9-15,(8)	9-15,8	9-15,8	9-15,9 (13)	-
	and.[e.]	-	-	-	15,(17),30		
9-15	γ	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9(13)	
	ε	15,29 33-15	15,(25) 29,33-15	-	15,(25), 29 f.	-	15.(29, 33-15)
	and.	(17?)	(17?)	-	17,30	-	
15	γ'	22	22	22	-	-	
	ε	9-15,25, 29,33-15	9-15,25, 29,33-15	-	(25),29[f.]	-	(9-15),25, 29,33-15
	and.	-	-	-	(17),30	-	
19	γ'	10 17,(25)	10 (25)	10 (17,25)	- -	10 17,(25)	-
	amd.	-	-	-	(26),30		
26	and.	-	-	-	19,29,30	10	-
22	γ'	15	15	15	n.u.[g.]	n.u.	-
30	ε	13	n.u.	-	n.u.	n.u.	13

a. Typ 17 und 24 in HAH und Neutralisation ohne Kreuzreaktionen
b. Meiser et al. (1969)
c. Wigand et al.,(1965),Wigand und Fliedner (1968)
d. Zahlen in Klammern: Kreuzreaktionen schwach oder nicht bei allen Immunseren vorhanden
e. andere Spezifität (s. Diskussion Nr. 4)
f. Antiseren gegen Typ 9-15 und 33-15 in der KBR nicht untersucht
g. nicht untersucht

Danksagung

Hiermit möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen:
Herrn Prof. Dr. med. R. Wigand für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit,
Frau I. Maurer für die Bereitstellung der Gewebekulturen, sowie Fräulein G. Hermeling und Frau Debusmann für erwiesene Hilfe.

Die Untersuchungen sind Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Forschungsprogrammes über Adenoviren.

Lebenslauf

Am 1. September 1941 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Wilhelm Wulff und seiner Ehefrau Anna Katharina geb. Esser in Düsseldorf geboren.
Nach meiner Schulzeit in Bremen, die ich 1962 mit dem Abitur abschloß, begann ich im gleichen Jahr das Studium der Medizin an der Universität Freiburg/Breisgau. Dort bestand ich 1963 das Vorphysikum und 1965 das Physikum. Danach setzte ich mein Studium an der Universität des Saarlandes fort. Das Medizinische Staatsexamen legte ich am 21.2.1969 in Homburg ab. Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an den Universitätskliniken in Homburg.
Seit Januar 1971 bin ich am Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Abteilung Virologie in Homburg als wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig.
Ich bin seit 1965 verheiratet und habe zwei Kinder.